

## ステロール生合成遺伝子の分子進化に関する研究 ～ Kyte & Doolittle の疎水性度解析による分子間比較～

Study on the molecular evolution of sterol biosynthesis genes  
Comparison through hydropathy analysis based on the method of  
Kyte & Doolittle between the gene products

西野 秀昭

清松 亜希菜

Hideaki NISHINO

Akina KIYOMATSU

福岡教育大学・理科教育講座 (生物)

(平成26年 9月30日受理)

### Abstract

For the purpose of studying the mechanism of molecular evolution of sterol biosynthesis genes, the three-dimensional structure of a gene product protein estimated as Medaka *Oryzias latipes* *DHCR7* was compared with the putative orthologs in addition to amino acid sequence homology. In this study the very problem has been the difficulty of purification of the *DHCR7* protein from endoplasmic reticulum membrane of any animal tissues because of inactivation of the membrane-bound enzyme after solubilization using any detergent. One possible approach could be the estimation of secondary structure in hydropathy using parameters of the analytical method of Kyte & Doolittle. Here the hydropathy of gene product designated as Medaka *DHCR7* was calculated, and then the profile pattern was compared with that of *Homo sapiens* or Zebra fish *Danio rerio* *DHCR7* products. As the results, they exhibited very similar hydropathy structure each other in all over the primary sequence level. However, in S-1 sequence, one hand, the first half of the primary sequence of Medaka *DHCR7* was not similar to that of *Homo sapiens* and Zebra fish. On the other hand, the second half of the primary sequence of Medaka *DHCR7* was similar to that of Zebra fish, but not that of *Homo sapiens*. It was evolutionary remark that the amino acids in both upper and bottom peaks of Kyte & Doolittle profile were coincided each other in the three animal species.

### 要 約

ステロール生合成遺伝子の分子進化のメカニズムを研究する目的で、メダカのステロール生合成遺伝子 *DHCR7* と考えられている遺伝子を確認するため、アミノ酸配列の類似性から比較するだけでなく、立体構造からの検討を行った。*DHCR7* は細胞内小器官の小胞体膜に結合したタンパク質、すなわち膜結合タンパク質であることから、その構造を保ったままでの単離精製は難しい。そこでアミノ酸への疎水性度パラメータを利用した Kyte & Doolittle の解析法による、*DHCR7* 遺伝子翻訳産物における分子全体の疎水性度を推定し、既知の *DHCR7* 遺伝子と比較を行った。その結果、分子全体ではヒトやゼブラフィッシュと類似の疎水性度パターンを示していた。しかし *DHCR7* 遺伝子ファミリーのうち、*DHCR7* のみに特有なアミノ酸配列である S-1 配列を含む配列に関しては、前半のパターンがヒトにもゼブラフィッシュにも一致しない一

方、後半のパターンはゼブラフィッシュと一致した。疎水性度の山や谷として三者で一致しているアミノ酸残基がいくつか見出され、いずれも進化的に保存されているアミノ酸残基であった。

## 1. はじめに

ステロール生合成遺伝子は、一般に真核細胞生物にのみ見出されることから、前核単細胞から真核単細胞、更に真核多細胞への生物進化を分子的視点から議論する好材料と考えられている<sup>1)</sup>。特にステロール生合成過程の最後に位置するステロール $\Delta 7$ -還元酵素は *DHCR7* 遺伝子にコードされているが、*DHCR7* 遺伝子は、ステロールが 5-en 構造である真核多細胞生物には存在するが、ステロールが 5,7-dien 構造である真核単細胞の出芽酵母などには見出されない。このことから、真核細胞が多細胞へ進化する際の *DHCR7* 遺伝子の関わりについて考察がなされている<sup>1)</sup>。

ニホンメダカ *Oryzias latipes* は、日本固有種の一つとして注目されている。分子生物学研究や遺伝子疾患研究のモデル生物として利用するためにゲノム解析も行われており、90%のゲノム塩基配列がデータベース化されている<sup>2)</sup>。先行研究において、メダカの *DHCR7* 遺伝子構造がメダカデータベースの情報を基に推定されている。その結果、他の生物種と同様に7つの exon からなることが報告されている。終止コドンを含め、読み枠 1419 塩基対、472 個のアミノ酸残基数で、ヒト (475 個) やゼブラフィッシュ (478 個) *DHCR7* に高度に類似した一次構造を有していた<sup>1)</sup>。また、*ERG24* やラミンBレセプターなどと構成される *DHCR7* 遺伝子ファミリーでの比較から見出されている、*DHCR7* にユニークなアミノ酸配列である S-1 配列もメダカ *DHCR7* 候補遺伝子に存在していた<sup>1)</sup>。

一方、*DHCR7* 遺伝子産物は、小胞体膜の細胞質側に配向しながらも 10 回ほど小胞体膜を貫通できる疎水的なアミノ酸配列を有している膜結合性タンパク質であることが、Kyte & Doolittle の方法などによる解析で明らかにされている<sup>3)</sup>。そこで、メダカ *DHCR7* 遺伝子とされている産物の膜結合性タンパク質としての疎水性度を解析し、他の生物種の *DHCR7* の疎水性度と比較することによって、メダカ *DHCR7* 候補遺伝子が *DHCR7* であることを確認することとした。

## 2. 研究方法

メダカ *DHCR7* 遺伝子は、先行研究のデータを利用した<sup>1)</sup>。ヒトとゼブラフィッシュ *DHCR7* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列 (cDNA) は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank 情報を用いた。Accession number は、ヒト *DHCR7* が NM\_001360 のものを利用した。一方、ゼブラフィッシュ *DHCR7* は NM\_201330 のものを用いた。

分子の疎水性度の解析には、タンパク質の高次構造解析サイトの一つ、Bioinformatics Resource Portal のメニューの EXPASY\_ProtScale (図 1) (<http://web.expasy.org/protscale/>) を用いた。設定メニューの中にある Window size は 19 とした。この 19 という数字は、アミノ酸配列中にアミノ酸残基が 19 個ある場合、19 個の各アミノ酸残基の疎水性度を合計した平均値が 10 番目のアミノ酸残基に与えられる事を示している。一般的に生体膜のような脂質二重層を貫通するのに必要なアミノ酸残基数は 20 個ほどとされているので、Window size を 19 に設定するのは生体膜を貫通する性質を有している適切な長さのアミノ酸配列を探すことになる。タンパク質の一部の部分構造が膜に結合する性質を既知のタンパク質で確認するため、小胞体膜結合性のタンパク質である cytochrome b5 で確認した。その GenBank データは、P00167 の 2013 年の最新情報を使用した。

## 3. 結果と考察

**Cytochrome b5 での Kyte & Doolittle 解析結果と立体構造の比較** : Cytochrome b5 は 134 アミノ酸残基からなるタンパク質で、そのカルボキシル (C) 末端側の 20 アミノ酸残基ほどが  $\alpha$ らせん構造をとって小胞体膜に結合している (図 2)。Cytochrome b5 での Kyte & Doolittle 解析の結果も図 2 と同様に C 末端側で 20 アミノ酸残基ほどで疎水性が高くなっており (図 3, 図 4)、この部分で膜に結合していることを示している。この結果を応用して、メダカ *DHCR7* 候補遺伝子の Kyte & Doolittle 解析結果を考察する。

メダカ *DHCR7* 候補遺伝子産物とヒト及びゼブラフィッシュとの比較：Window size は cytochrome b5 の場合と同様に 19 に設定し、*DHCR7* 遺伝子産物分子全体で Kyte & Doolittle 解析を行った。その際に、*DHCR7* 遺伝子産物が 10 回ほど生体膜を貫通した分子構造であることに着目した (図 5)。その結果、メダカ *DHCR7* 候補遺伝子産物の場合も、ヒトやゼブラフィッシュと同様に図 5 のような疎水的な二次構造パターンを有していることが分かった (図 6)。

**S-1 配列を含む領域での Kyte & Doolittle 解析：**メダカ *DHCR7* 遺伝子の S-1 配列と考えられる配列を含む領域における疎水性度を、ヒトやゼブラフィッシュと比較した (図 7)。その結果、profile の前半の部分は、ヒトとゼブラフィッシュで一致している一方、メダカとは一致していなかった。後半部分はゼブラフィッシュと一致し、ヒトとは一致しなかった。しかし、ヒトやゼブラフィッシュの profile の山や谷とメダカとで一致している場

合、相当するアミノ酸残基は三者で同じアミノ酸残基で、進化的に保存されているアミノ酸残基であることが分かった。

以上の結果から、先行研究で推定されたメダカ *DHCR7* 候補遺伝子は、ステロール  $\Delta 7$ -還元酵素をコードした *DHCR7* 遺伝子であることが確認されたと考えられる。

#### 4. 参考文献

- 1) 西野秀昭・甲斐慎：メダカゲノム情報によるステロール生合成遺伝子の解析～メダカ *DHCR7* 遺伝子全構造の推定～，福岡教育大学紀要，第 63 卷，第 3 分冊，81-89，2014
- 2) NBRP，メダカ，<http://www.nbrp>
- 3) 諸見まき他 3 名：哺乳類ステロール  $\Delta 7$ -還元酵素の酵母でのヘテロ発現とユニーク配列への部位特異的変異導入，脂質生化学研究，第 43 卷，278-281，2001

Home | [Contact](#)

## ProtScale

**ProtScale**

**ProtScale** [[Reference](#) / [Documentation](#)] allows you to compute and represent the profile produced by any amino acid scale on a selected protein.

An **amino acid scale** is defined by a numerical value assigned to each type of amino acid. The most frequently used scales are the hydrophobicity or hydrophilicity scales and the secondary structure conformational parameters scales, but many other scales exist which are based on different chemical and physical properties of the amino acids. This program provides 57 predefined scales entered from the literature.

Enter a **UniProtKB/Swiss-Prot** or **UniProtKB/TrEMBL** accession number (AC) (e.g. **P05130**) or a sequence identifier (ID) (e.g. **KPC1\_DROME**):

Or you can paste your own sequence in the box below:

Please choose an amino acid scale from the following list. To display information about a scale (author, reference, amino acid scale values) you can click on its name.

<input type="radio"/> Molecular weight	<input type="radio"/> Number of codon(s)
<input type="radio"/> Bulkiness	<input type="radio"/> Polarity / Zimmerman
<input type="radio"/> Polarity / Grantham	<input type="radio"/> Refractivity
<input type="radio"/> Recognition factors	<input type="radio"/> Hphob. / Eisenberg et al.
<input type="radio"/> Hphob. OMH / Sweet et al.	<input type="radio"/> Hphob. / Hopp & Woods
<input checked="" type="radio"/> Hphob. / Kyte & Doolittle	<input type="radio"/> Hphob. / Manavalan et al.
<input type="radio"/> Hphob. / Abraham & Leo	<input type="radio"/> Hphob. / Black
<input type="radio"/> Hphob. / Bull & Breese	<input type="radio"/> Hphob. / Fauchere et al.
<input type="radio"/> Hphob. / Guy	<input type="radio"/> Hphob. / Janin
<input type="radio"/> Hphob. / Miyazawa et al.	<input type="radio"/> Hphob. / Rao & Argos
<input type="radio"/> Hphob. / Roseman	<input type="radio"/> Hphob. / Tanford
<input type="radio"/> Hphob. / Wolfenden et al.	<input type="radio"/> Hphob. / Welling & al
<input type="radio"/> Hphob. HPLC / Wilson & al	<input type="radio"/> Hphob. HPLC / Parker & al
<input type="radio"/> Hphob. HPLC pH3.4 / Cowan	<input type="radio"/> Hphob. HPLC pH7.5 / Cowan
<input type="radio"/> Hphob. / Rf mobility	<input type="radio"/> HPLC / HFBA retention
<input type="radio"/> HPLC / TFA retention	<input type="radio"/> Transmembrane tendency
<input type="radio"/> HPLC / retention pH 2.1	<input type="radio"/> HPLC / retention pH 7.4
<input type="radio"/> % buried residues	<input type="radio"/> % accessible residues
<input type="radio"/> Hphob. / Chothia	<input type="radio"/> Hphob. / Rose & al
<input type="radio"/> Ratio hetero end/side	<input type="radio"/> Average area buried
<input type="radio"/> Average flexibility	<input type="radio"/> alpha-helix / Chou & Fasman
<input type="radio"/> beta-sheet / Chou & Fasman	<input type="radio"/> beta-turn / Chou & Fasman
<input type="radio"/> alpha-helix / Deleage & Roux	<input type="radio"/> beta-sheet / Deleage & Roux
<input type="radio"/> beta-turn / Deleage & Roux	<input type="radio"/> Coil / Deleage & Roux
<input type="radio"/> alpha-helix / Levitt	<input type="radio"/> beta-sheet / Levitt
<input type="radio"/> beta-turn / Levitt	<input type="radio"/> Total beta-strand
<input type="radio"/> Antiparallel beta-strand	<input type="radio"/> Parallel beta-strand
<input type="radio"/> A.A. composition	<input type="radio"/> A.A. comp. in Swiss-Prot
<input type="radio"/> Relative mutability	

Window size:

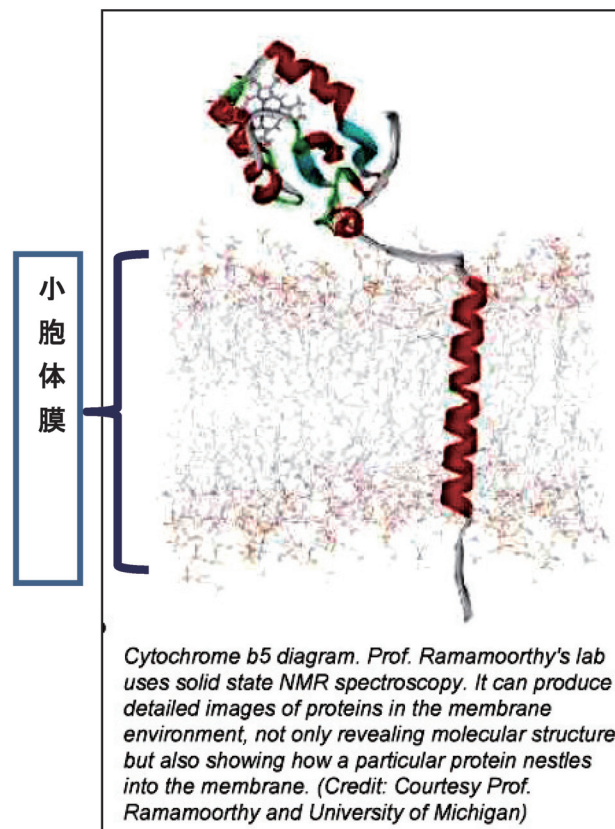
Relative weight of the window edges compared to the window center (in %):

Weight variation model (if the relative weight at the edges is < 100%):  linear  exponential  
 Do you want to normalize the scale from 0 to 1?  yes  no

If you need more information about how to set these parameters, please click [here](#).



図1 EXPASY\_ProtScale のページ  
 Kyte & Doolittle の項目は○で示している。



<http://www.sciencedaily.com/releases/2007/09/070914113852.htm> より引用

図2 Cytochrome b5 の膜結合様式

Cytochrome b5 のカルボキシル末端は小胞体膜に結合している。膜を貫通している  $\alpha$  ラせん構造部分は疎水的な性質を有していて、リン脂質二重層の炭化水素鎖と疎水性相互作用で膜に結合している。

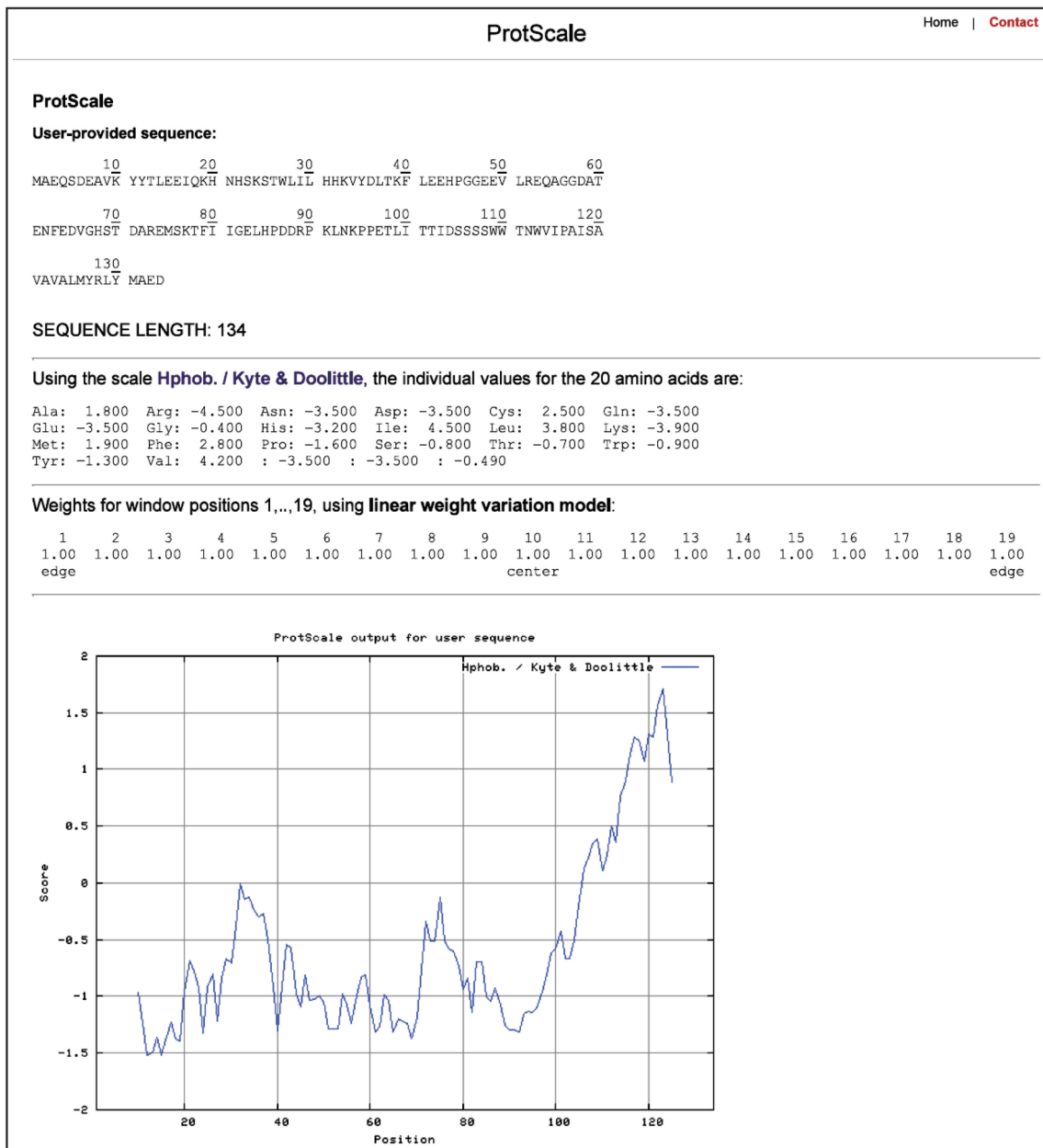


図3 Human cytochrome b5でのKyte & Doolittle解析結果  
GenBank データは P00167 を使用した。Window size は 19 で解析した。

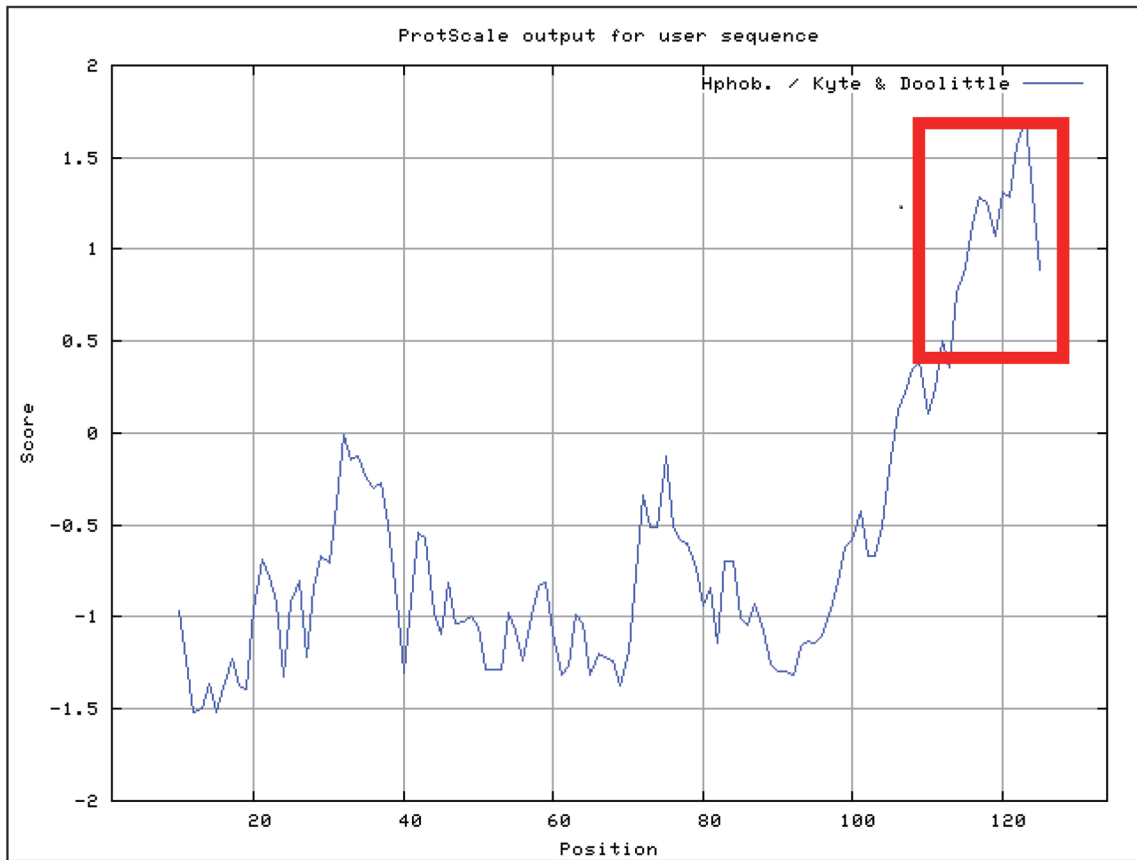


図4 Cytochrome b5 の Kyte & Doolittle 解析による疎水性 profile

左側がアミノ (N) 末端側で、右側がカルボキシル (C) 末端側。C 末端側で Score が 0.5 以上 (太枠) でアミノ酸残基数は 20 個ほどであり、図 2 の膜結合部分の  $\alpha$  ラセンに相当する。

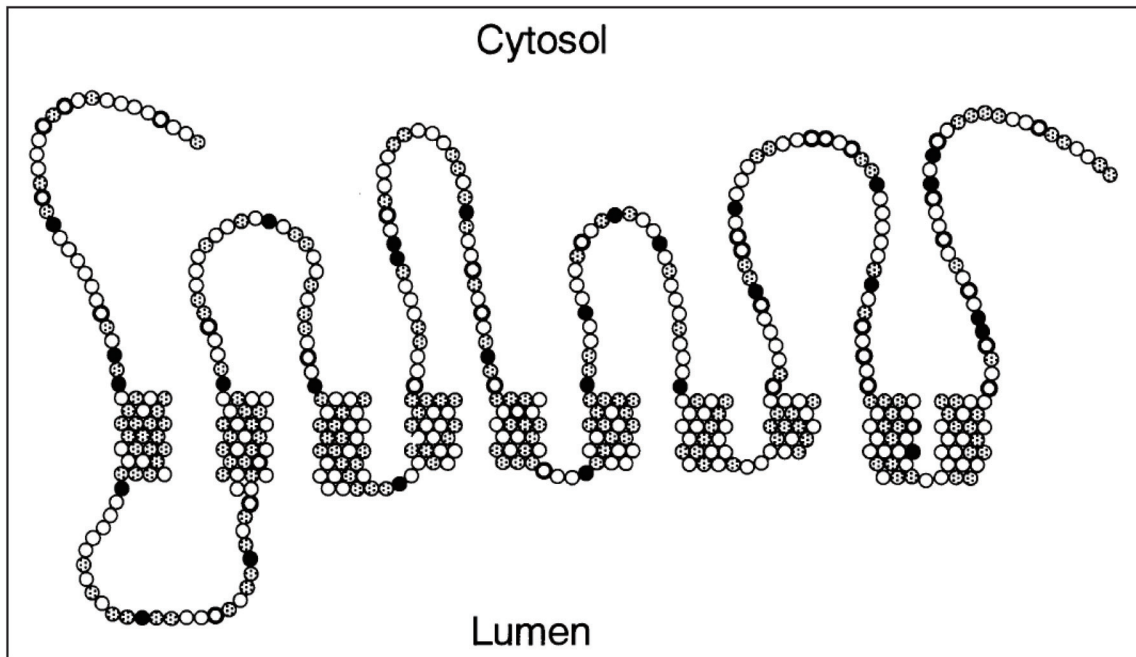


図5 ステロール  $\Delta 7$ -還元酵素 (*DHCR7* 遺伝子産物) の小胞体膜における配向性\*

灰色丸：疎水性；太白丸：正の電荷；黒丸：負の電荷；細白丸：その他の性質のアミノ酸残基。\*参考文献の諸見他から引用。疎水性アミノ酸残基が多い配列は生体膜に結合している  $\alpha$ -らせん構造を模している。ここで示す構造は、以下の4つの性質から説明されている。

1. Insensitivity to proteinases (プロテアーゼ不感受性)
2. Inhibition by metal-chelators (金属キレーターで酵素活性阻害)
3. Hydropathy scale by Kyte & Doolittle (疎水性度)
4. Type II signal anchor sequence (II型シグナルアンカー配列)



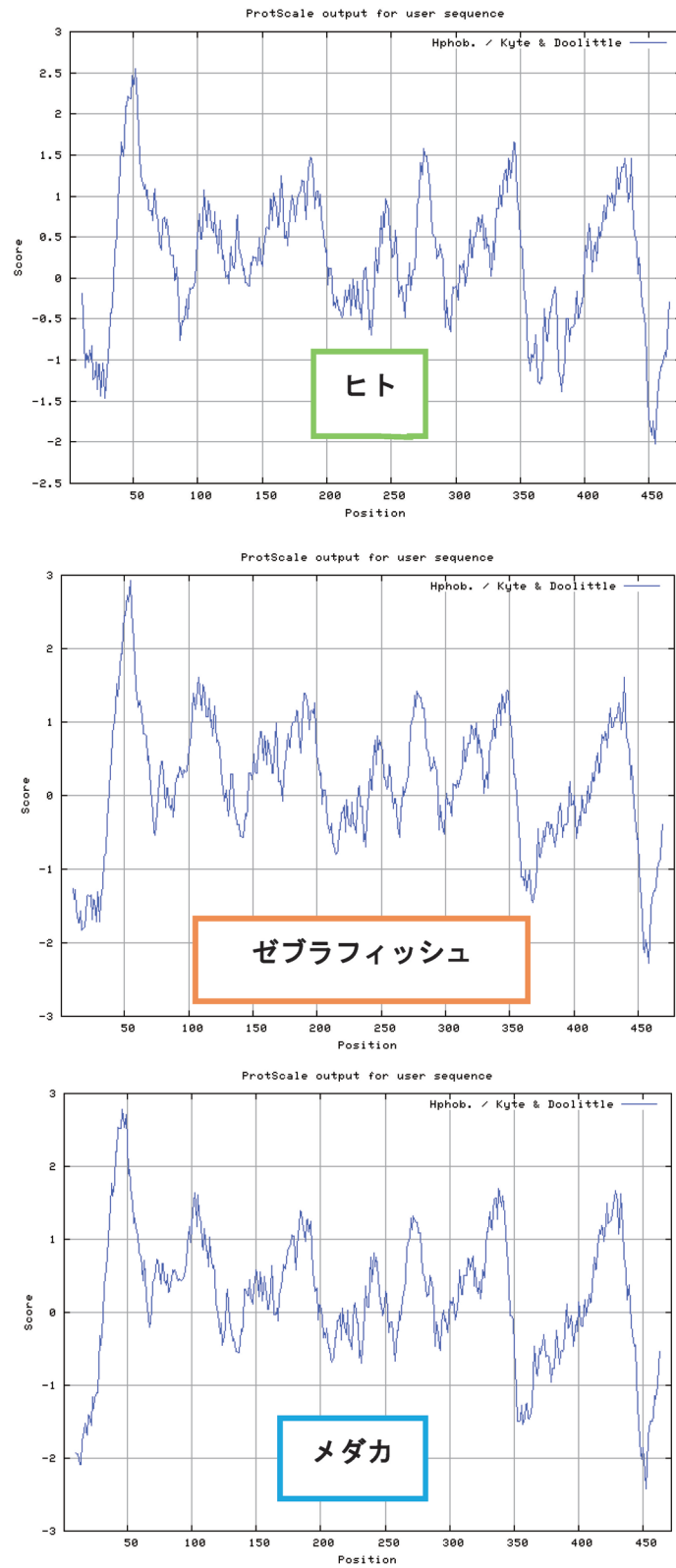


図6 ヒト及びゼブラフィッシュ *DHCR7* とメダカの Kyte & Doolittle 解析 profile の比較

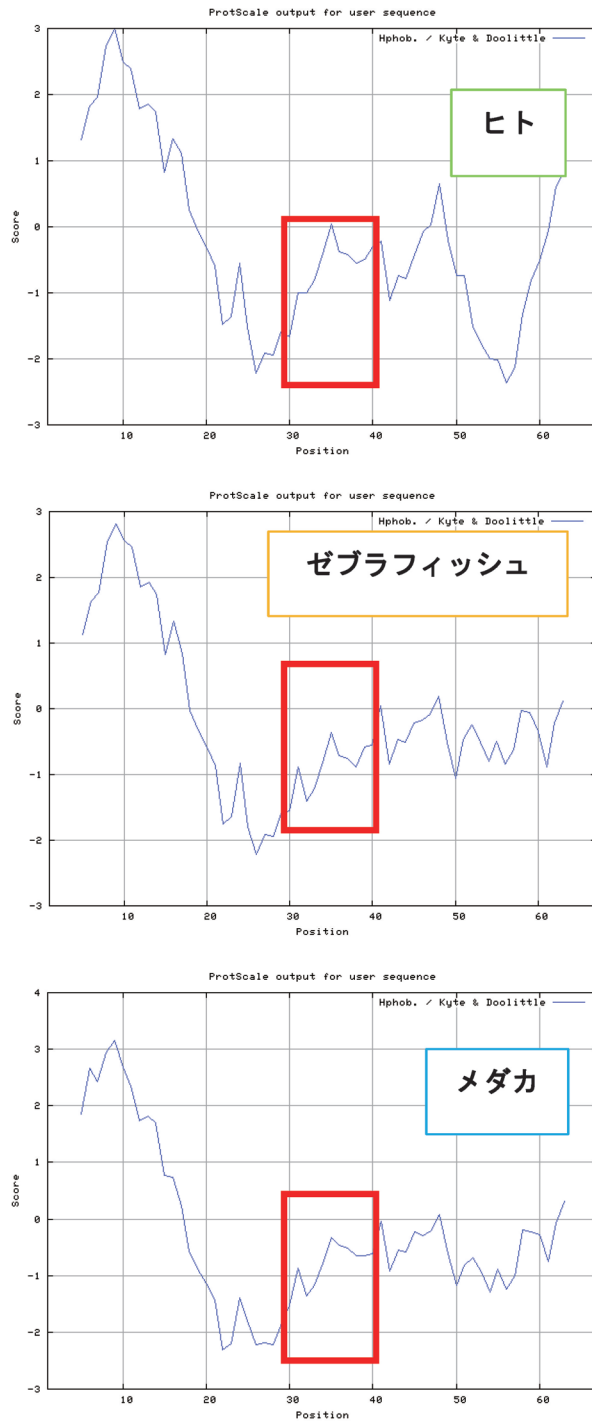


図7 ヒト及びゼブラフィッシュ *DHCR7* とメダカの S-1 配列の Kyte & Doolittle 解析 profile の比較  
S-1 配列を含む 67 アミノ酸残基で、30～39 番目のアミノ酸残基（太枠）が S-1 配列。